Таблица

Жизнеспособность эмбрионов в связи со степенью снижения их качества после замораживания и оттаивания

Показатели	Степень снижения качества эмбриона			
	0 балла	0,5 балла	1 балл	> 1 балла
Кол-во реципиентов	218	243	291	99
Стали стельными	124	109	121	29
Стельность, %	56,9±3,4	44,8±3,2	41,6±2,9	29,3±4,6

Нашими исследованиями установлено, что жизнеспособность, а вместе с нею и приживляемость криоконсевированных эмбрионов после нехирургической пересадки зависят от степени изменения состояния эмбриона в процессе замораживания-оттаивания, и что приживляемость эмбрионов обратно пропорциональна степени повреждения их в процессе криоконсервации (r = -0,98, p<0.001).

Отсюда следует, что при формировании эмбриобанков, учитывая высокую генетическую ценность эмбрионов, закладываемых на хранение, все полученные эмбрионы с оценкой от 3 баллов и выше необходимо замораживать. Окончательное решение о пригодности эмбрионов к пересадкам принимается после их оттаивания и оценки согласно действующей системе определения качества. По степени изменения качества эмбрионов после оттаивания прогнозируется уровень их приживляемости и выбраковываются нежизнеспособные эмбрионы.

SUMMARY

Bovine embryos at stage of development 7-8 days were estimated morfologically after nonsurgical recovery. Repeated morfological estimation was carried out after cryopreservation and thawing. The prediction of the pregnancy rate after transplantation of thawed embryos was made by the comparison of morphological estimations before freezing and after freezing.

It happened that the pregnancy rate of recipients after embryotransfer was back proportional to the degree of reducing of thawed embryos quality. The embryos viability after transfer was 56,9% (n=218), if their quality mark before cryopreservation was same as after cryopreservation. The pregnancy rates were 43,1% (n=534) and 29,3% (n=99) when the quality marks of thawed embryos have been reduced respectively by unity and more than by unity.

The coefficient of correlation was -0,98 (P<0,001). This method increases efficiency of embryo transfer as it allows to utilize thawed embryos with quality mark “fair” that they have been before freezing too. The pregnancy rate after transfer these embryos (n=30) was 43,3%.

УДК: 576.3:576.535:57.08

Г.Г. Миллер

ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, РАМН, Москва

ЗНАЧЕНИЕ КОНТАМИНАЦИЙ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ И СОХРАНЕНИИ ЧИСТЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ НУЖД БИОТЕХНОЛОГИИ И ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Задача настоящего сообщения состоит в привлечении внимания к одной из важнейших проблем современной биологии - проблеме контаминации, которая не только по-прежнему актуальна, поскольку имеет планетарное распространение, но и становится все более и более значимой по мере развития современных биотехнологий. В приложении к теме данной конференции ее беспрецедентно широкое распространение, по-видимому, следует отнести к моменту возникновения эры клеточных культур. Однако сам термин всеобъемлющий, используется вплоть до ядерной физики и, несмотря на смысл перевода, означающий «загрязнение», его можно рассматривать и как один из источников формирования биологического разнообразия. Есть веские основания полагать, что контаминация открывает путь для неконтролируемого нетипично-

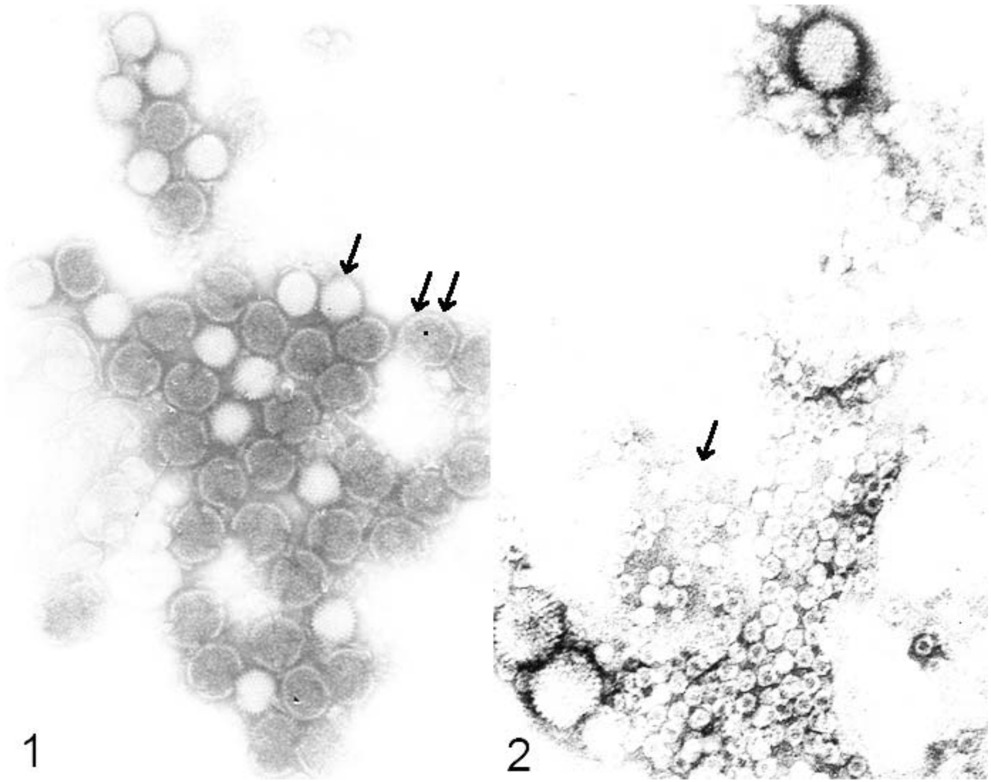


Рисунок 1, 2. Препараты аденовируса человека, очищенные в градиентах. Демонстрируется контаминация аденовирусом птиц CELO (1, указано стрелками) и обычно детектируемое соотношение адено (три частицы вверху и внизу) и дефектного аденоассоциированного парвовируса (2, указано стрелкой)

го распространения в природе различных биологических таксонов и возможно является элементом эволюции биологических макромолекул. Это происходит после многочисленных перекрестных контаминаций различных субстратов при содействии универсального механизма отбора нового фенотипа. Серьезность такой природной и производственно – технологической проблемы трудно переоценить. Контаминации можно подразделить на типы и обсуждать обнаруживаемые явления природы и в особенности современные экспериментальные данные с учетом этого факта.

Ряд природных ассоциаций, начиная с неродственных макромолекул, мог возникнуть как первоначальная контаминация. Открытие возможности горизонтальной передачи ДНК и явление обратной транскрипции может объяснить появление новых «химерных» структур в живой природе.

После того, как была доказана неразрывная связь процессов межвидового обмена генетической информацией, дефектностью и хелпер-факторами с эволюционными процессами, в 1972 г. были открыты инфекционные формы сателлитных РНК у высших растений. Эти РНК, названные вироидами, способны проявлять биологическую активность только в ассоциации с истинными вирусами. Позднее, в 1980-х годах, когда в гепатоцитах печени больных хроническим гепатитом В был обнаружен уникальный инфекционный фактор, названный «дельта – антигеном», оказалось, что это новый дефектный вирус, составляющий часть популяции вируса гепатита В. Он способен проявлять инфекционность только в присутствии основного вируса, а его геном, представленный односпиральной РНК, по своей структуре, размерам и способу репликации тождествен только вироидам высших растений. Так стал известен новый вирус гепатита D (дельта – гепатит).

То, что вирусы являются идеальными медиаторами межвидового генетического обмена, делает их мощным двигателем эволюционного процесса в царстве Vira. В процессе эволюции происходит как потеря функциональной полноценности генетического материала, так и приобретение новых свойств. Из того, что происходит на глазах современных поколений,

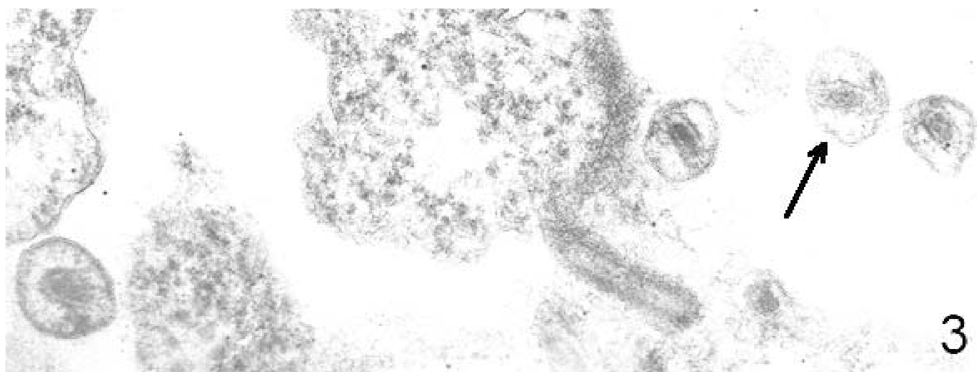


Рисунок 3. Ультратонкий срез клетки человеческой перевиваемой линии HeLa, контаминированной вирусом (указано стрелкой), по морфологическим критериям, размерам, эндогенной Mg-зависимой ОТ и общности gag-протеинов идентичным экзогенному обезьяньему вирусу Мэзон-Пфайцер (M-PMV)



Рисунок 4. Ультратонкий срез клетки человеческой промоноцитарной линии U937, контаминированной хламидией (указано стрелкой), предположительно птичьего происхождения

ближе всего обратиться к эволюции вирусов иммунодефицита человека, прошедших за короткое время путь от непатогенных обезьяньих вариантов до низко или высоко патогенных человеческих. Потеря в эволюции функциональной полноценности видимо произошла и с сателлитными микроорганизмами и вирусами, такими как адено и аденоассоциированный парвовирус, дефектный по инфекционности (рис. 2). Подобный пример очень актуален при конструировании вирусных векторов и применяемых для этих целей клеток – упаковщиц. Здесь надо быть уверенным в отсутствии контаминантов в тех и других системах. Наиболее частым контаминантом используемых пулов различных аденовирусов (например, обезьяны, птиц или человека) являются не только указанная выше ассоциация, но и обезьяний вирус 40 (SV40) или разные виды самих аденовирусов (например, птичий CELO и человеческий аденовирус типа 5) (рис. 1). Наработка чистого упаковочного вируса для векторной конструкции представляет немалые проблемы, что связано в первую очередь с используемой процедурой накопления и очистки. Дифференциальное центрифугирование и даже разделение по плотности в градиентах не всегда дает желаемый результат. По-видимому, дело заключается в сильных белковых взаимодействиях, не позволяющих надежно разделить структуры даже значительно различающиеся по размерам и плотности. Поэтому такие процедуры нуждаются в поэтапном контроле. Наиболее эффективным, простым в исполнении и быстрым методом контроля для данных случаев является электронная микроскопия. Что касается клеток, предназначенных для трансформации векторными конструкциями, то необходимо, чтобы для получения, например, культуры куриных эмбриональных фибробластов, источником служили яйца безлейкозных кур, что должно быть отражено в описании соответствующих материалов и методов исследования. В противном случае кле-

точные культуры будут содержать геномы вирусов лейкозно – саркомного комплекса птиц и полную репродукцию вирусов в культурах. Дополнительной сложностью может оказаться наличие дефектности у высоко онкогенного для мышей варианта вируса саркомы Рауса птиц, помощником которому в естественных условиях служит вирус лейкоза или другие слабо онкогенные или не онкогенные эндогенные лейкозные вирусы. Поэтому нет уверенности, что при трансфекции векторной конструкции в такие клетки, оценки эффективности трансформации последних и интерпретация полученных данных будут однозначны и корректны. Надо в свою очередь заметить, что пока окончательно не решен вопрос о происхождении онкогена в геноме эукариотической клетки, предположение о его возникновении в процессе эволюции как генетического контаминанта может иметь право на существование.

Нельзя не упомянуть также о хорошо известном явлении трансдукции, которое широко распространено среди микробов и играет основополагающую роль в изменчивости бактерий. Вирусы лизогенных бактерий – фаги способны захватывать фрагмент ДНК донорской клетки и переносить его (трансдуцировать) в клетку реципиента. В этой связи понятие паразитизм также может включать контаминацию как его частный случай, зависимый от степени дефектности паразита или хозяина. Примером может служить циркумполярное распространение микроорганизмов семейства Mycoplasmatacea среди низших и высших растений и всех млекопитающих и повсеместная контаминация любых производственных биологических субстратов различными видами этого прокариота. Несмотря на то, что представители этого семейства являются только мембранными паразитами, а не облигатными внутриклеточными, как вирусы, различия в их патогенности и характер влияния на биосинтетические процессы в эукариотической клетке варьируют от незначительных до ярко выраженных.

В клеточной биотехнологии и клеточной инженерии наиболее часты внутри и межвидовые контаминации. На основании электрофоретической подвижности фермента Г-6ФДГ и кариотипирования стало известно, что существовавшее с 60-х – 70-х годов прошлого века первоначальное разнообразие уникальных перевиваемых клеточных культур человеческого и животного происхождения, полученных из нормальных и опухолевых тканей, в результате многочисленной перекрестной контаминации было вытеснено наиболее быстро пролиферирующими клетками злокачественного происхождения HeLa (карцинома шейки матки человека) и L929 (миелобластома мышей). Дополнительные доказательства наличия контаминации были получены электронно-микроскопически. Так, в подавляющем большинстве используемых сегодня штаммов перевиваемых клеток человеческого происхождения содержится вирус из семейства Retroviridae, который по морфологическим и серологическим признакам относится к вирусу рака молочной железы обезьяны (M-PMV) (рис. 3). То есть, налицо контаминация человеческих клеток либо вирусом обезьян, либо продуцировавшими его другими клетками. Содержание во многих предполагаемых «человеческих» культурах неинфекционного внутрицистернального ретровируса типа А, который можно идентифицировать только электронно-микроскопически, с абсолютной определенностью указывает на мышиное происхождение этих клеточных культур. В лабораториях разных стран для разных нужд (в том числе и производственных) используют человеческие промоноцитарные перевиваемые клетки U937, контаминированные хламидией.. Культура инфицирована латентно, несмотря на наличие полного цикла развития этого микроорганизма. Клетки сохранили присущий им высокий пролиферативный индекс и не измененные требования к ростовым факторам. Этот важный факт представляет собой самостоятельный биологический феномен, так как до настоящего времени получить не цитоцидную персистентную хламидийную инфекцию клеточных культур не удавалось (рис. 4).

В данном сообщении приведены лишь отдельные примеры необъятной проблемы контаминаций в биологических системах. Расследование их источников и путей реализации чрезвычайно затруднительно и подлежит самостоятельному скрупулезному анализу с применением многих современных методов исследования биологических макромолекул. Однако совершенно очевидно, что при наличии всех описанных обстоятельств, получение и сохранение чистых производственных субстратов и получаемых с их помощью чистых биологических продуктов, как и адекватная оценка истинного биологического разнообразия представляется в современных условиях задачей архисложной.